

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年4月25日 (25.04.2002)

PCT

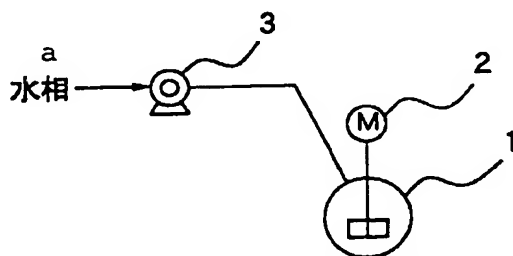
(10) 国際公開番号  
WO 02/32564 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: B01J 3/00, (71) 出願人 および  
13/02, A61K 9/127, A61J 3/07 (72) 発明者: 大竹勝人 (OTAKE, Katsuto) [JP/JP]; 〒305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人 産業技術総合研究所つくばセンター内 Ibaraki (JP). 阿部正彦 (ABE, Masahiko) [JP/JP]; 〒278-0017 千葉県野田市大殿井58-71 Chiba (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08907
- (22) 国際出願日: 2001年10月11日 (11.10.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 酒井秀樹 (SAKAI, Hideki) [JP/JP]; 〒247-0071 神奈川県鎌倉市玉縄2-17-30 Kanagawa (JP). 井村知弘 (IMURA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒283-0003 千葉県東金市道庭321 Chiba (JP). 貝瀬千尋 (KAISE, Chihiro) [JP/JP]. 桜井正利 (SAKURAI, Masatoshi) [JP/JP]. 新井陽一郎 (ARAI, Yoichiro) [JP/JP]. 金子晃久 (KANEKO, Teruhisa) [JP/JP]; 〒156-0054 東京都世田谷区桜丘4-24-16 株式会社 シュウウエムラ化粧品 研究所内 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-313599  
2000年10月13日 (13.10.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 株式会社 シュウウエムラ化粧品 (SHU UEMURA COSMETICS INC.) [JP/JP]; 〒107-0062 東京都港区南青山5丁目7番17号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 岸田正行, 外 (KISHIDA, Masayuki et al.); 〒100-0005 東京都千代田区丸の内2丁目6番2号 丸の内八重洲ビル424号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING LIPOSOME AND APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称: リポソームの製造方法およびその装置



a...AQUEOUS PHASE

(57) Abstract: A process for producing liposomes having a substance encapsulated therein, characterized by adding an aqueous phase containing the substance to be encapsulated to a homogeneous liquid mixture of a phospholipid or glycolipid and carbon dioxide in a supercritical state or kept at a temperature or pressure not lower than the critical point. Thus, liposomes having a high efficiency of retention can be formed through fewer steps without using any harmful organic solvent.

(57) 要約:

超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素とリン脂質または糖脂質の均一混合流体中に、封入物質を含む水相を加えることを特徴とする封入物質を内包したリポソームの製造方法により、有害な有機溶媒を用いずに、より少ない工程で、保持効率の高いリポソームを形成することができる。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/32564 A1



添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## リポソームの製造方法およびその装置

## 技術分野

- 5      本発明は、超臨界二酸化炭素を用いたリポソームの製造方法およびその装置に関するものである。

## 背景技術

- 10      脂質 2 分子膜であるリポソームは、リポソーム内に各種の水溶性物質等を封入できるため、薬理活性物質を生体内に運ぶキャリアー材料等として用いられている。

- リポソームは、両親媒性物質であるリン脂質のサスペンションを、攪拌等の処理を行うことにより得られる。リポソームを工業的に調製する方法としては、(1) リン脂質または糖脂質のサスペンションを超音波で処理する超音波処理法、(2) リン脂質または糖脂質と界面活性剤の混合ミセルを形成し界面活性剤を除去する  
15      界面活性剤除去法、

(3) 有機溶媒に溶かしたリン脂質または糖脂質溶液を水槽に注入して、水と有機溶媒の界面でリポソームを形成させる有機溶媒注入法、

- (4) リン脂質または糖脂質を懸濁した水溶液を凍結した後、熔融して脂質二重  
20      膜を形成し、これをさらに凍結熔融してリポソームを形成させる凍結融解法、

(5) 水に溶解しない有機溶媒に、少量の水系溶媒を加え、超音波をあてて W/O エマルジョン (逆ミセル) を形成し、有機溶媒を減圧下で除去する逆相蒸発法、

- (6) 超臨界二酸化炭素とエタノールの混合流体にリン脂質または糖脂質を溶解し、減圧過程で保持対象水溶液を攪拌注入する超臨界二酸化炭素法 (特開平 6 -  
25      3 1 5 6 2 4 号公報等) などが知られている。なお、超臨界二酸化炭素法の概略を、図 3 を用いて詳しく説明する。すなわち、超臨界二酸化炭素とエタノールをそれぞれポンプ 3 3, 3 2 で送り、リン脂質を充填したカラム 3 1 へ通す。リン脂質は二酸化炭素とエタノールの混合流体に溶解した状態で減圧弁 3 4 まで運ば

れ、減圧される。減圧過程でリン脂質は析出するが、このとき保持対象となる水溶性物質を含む水相をポンプ 35 を介して流入させ、ミキサー 36 で攪拌することにより、リポソームをミキサー 36 内で形成させる。

しかしながら、上記従来技術には下記のような問題点が存在し、工業的にリポソームを製造する方法および装置は知られていなかった。

(1) 超音波処理法

調製したリポソームは、サイズが  $0.002 \sim 0.2 \mu\text{m}$  と比較的そろった一枚膜リポソーム (SLV) が得られる利点があるものの、リポソーム内の水溶性物質の保持容量が低いという問題点がある。

10 (2) 界面活性剤除去法

界面活性剤を透析により除去しなければならないという問題点がある。

(3) 有機溶媒注入法

水溶性物質の保持効率が悪く、有機溶媒の除去が必要となる問題点がある。

(4) 凍結融解法

15 保持効率が低いという利点があるが、凍結するためのエネルギーコストがかさむという問題点がある。

(5) 逆相蒸発法

保持効率が低いという利点があるが、有機溶媒の除去が必要となる問題点がある。

20 (6) 超臨界二酸化炭素法

特開平 6-315624 号公報等に記載された方法は、超臨界状態においてリポソームを形成しているのではなく、超臨界流体を用いた急速膨張法 (RESS) によるものである。この方法は、減圧により溶解度が急激に低下し、微粒子状に析出するリン脂質に水溶液を混合することによりリポソームを製造する方法である。

25 以上のように、上記 (1) ~ (6) の従来方法は、数段階に分かれた操作が必要であったり、人体に有害な有機溶媒を使用することが多く、また製造段階で有機溶媒の除去などのために多量のエネルギーを必要とする欠点があった。

本発明が解決しようとする課題は、有害な有機溶媒を用いずに、より少ない工程で、保持効率の高いリポソームを形成する方法および装置を提供することにある。

## 5 発明の開示

本発明者らが、鋭意研究を重ねたところ、超臨界二酸化炭素を用いて、一段でリポソームを製造する方法を見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素にリン脂質または糖脂質を溶解させた混合物中に、封入物質を含む水相を加えることを特徴とする封入物質を内包したリポソームの製造方法、  
10 超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素にリン脂質または糖脂質を均一に溶解させた混合流体を圧入する耐圧反応器と、該耐圧反応器内の混合物中へ、水溶性または親水性の封入物質を含む水相を流入させる水相流入手段を有することを特徴とする封入物質を内包したリポソームの製造装置、  
15 および耐圧反応器と、該耐圧反応器へ、超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素を流入させる超臨界二酸化炭素流入手段と、助溶媒に均一に分散させたリン脂質または糖脂質を流入させるリン脂質等流入手段と、封入物質を含む水相を流入させる水相流入手段を有することを特徴とする封入物質を内包したリポソームの製造装置に関するものである。

20 本発明方法の特徴は、超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素にリン脂質を均一に溶解させた混合物中に、水溶性または親水性の封入物質を含む水相を加えて、一段で封入物質を内包するリポソームを製造することにある。本発明方法により製造したリポソームは、保持効率が高いため、従来のリポソームに比べて、より多量に封入物質を内包させることができる。

25 本発明における超臨界状態の二酸化炭素とは、臨界温度（30.98℃）および臨界圧力（7.3773±0.0030MPa）以上の超臨界状態にある二酸化炭素を意味し、臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素とは、臨界温度だけ、あるいは臨界圧力だけが臨界条件を超えた条件下の二酸化炭素を意味

する（ただし、もう片方が臨界条件をこえていないものである）。以下、超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素を「超臨界二酸化炭素」と総称する。

5 本発明におけるリン脂質または糖脂質は、脂質 2 分子膜を形成しうる化合物であれば特に限定されない。

リン脂質は、ホスファチドともいわれ、複合脂質のうちリン酸エステルおよび C-P 結合を持つ一群の物質の総称である。本発明におけるリン脂質としては、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイ  
10 ノシトール、カルジオピン、卵黄レシチン、水添卵黄レシチン、大豆レシチン、水添大豆レシチン等のグリセロリン脂質、スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール等のスフィンゴリン脂質を挙げることができる。

糖脂質としては、例えばジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセ  
15 リド硫酸エステル等のグリセロ脂質、ガラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド硫酸エステル、ラクトシルセラミド、ガングリオシド G 7、ガングリオシド G 6、ガングリオシド G 4 等のスフィンゴ糖脂質を挙げることができる。

リン脂質と超臨界二酸化炭素との均一混合物を調製するに際し、助溶媒を用いることが好ましい。助溶媒を系に添加することにより、超臨界二酸化炭素に対する難溶性の封入物質の溶解度を増加させることができる。助溶媒は超臨界二酸化  
20 炭素に対して、15 wt % 以下添加すればよい。15 wt % を超えるとエタノールの液相が析出するため好ましくない。なお、エタノールの添加はリポソームの形成を阻害するためなるべく少ない方が好ましい。

このような目的で用いられる助溶媒としては、例えばエチルアルコール等を挙  
25 げることができる。

リン脂質と超臨界二酸化炭素の均一混合物に、加える水相は、リポソームに内包させる封入物質を含むものである。

本発明における、封入物質とは、水溶性または親水性の物質であれば特に限定

されない。

水相の添加量は、水が流動性をもって流入できる範囲で、なおかつリポソームの形成が阻害されない範囲で適宜選択すればよい。

- 5 水溶性または親水性の封入物質として、以下のような薬理活性成分を挙げることができる。

- 薬理活性成分としては、例えば、リン酸Ｌ－アスコルビルマグネシウム、アスコルビン酸グリコシド、グリチルリチン酸ジカリウム、β－グリチルレチン酸、グリチルレチン酸アンモニウム、グリチルレチン酸ステアリル、エスチン、エスクリン、パントテニルアルコール、パントテン酸とその塩、チアミン、フラビン、  
10 葉酸または抗生物質や、少なくとも１種以上の非ステロイド系抗炎症薬、ケトプロフェン、イブプロフェン、ブフェキサマクまたはインドメタシン等を挙げることができる。本発明方法により、これらの薬理活性成分を従来に比べて多量にリポソームへ内包することが可能となったため、本発明のリポソームを外用剤に利用した場合は経皮吸収の増加が、内服薬に利用した場合は体内への吸収が増加  
15 するものと期待される。

- また本発明において、封入物質として以下の水溶性色素を挙げることができる。水溶性色素としては、たとえば赤色１０４号、赤色２号、赤色３号、青色１号、青色２号、黄色４号、黄色５号、緑色３号、カルミン、カーサミン、紅麴色素、クチナシ色素、アントシアニン色素またはクロロフィル等を挙げることができる。  
20 これらの水溶性色素は、すぐに酸化されてしまったり、退色するなど非常に不安定であるが、これらの水溶性色素をリポソーム中に内包させることにより、安定した色素を提供することができる。なお、リポソーム内における水溶性色素の耐酸化性を向上させるために、アスコルビン酸またはその塩、亜硫酸塩を酸化防止剤として水相に添加してもよい。

- 25 本発明において、封入物質が含まれる水相を構成する媒体としては、蒸留水、純水、海洋深層水、海洋深層水の限外濾過水等を挙げることができる。特に、海洋深層水には繊維細胞の増殖作用があるため、水相の媒体として海洋深層水を使用することにより、細胞増殖を促進しかつ、経皮吸収のよいリポソームが得られ

ることが期待される。

本発明方法において、超臨界二酸化炭素とリン脂質の混合物に、水相を加えてリポソームを製造するには、超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素と、リン脂質または糖脂質、必要であれば助溶媒の均一混合流体を激しく攪拌している中に、封入物質を含む水相を導入すればよい。当初透明であった均一混合流体は水相の導入とともに徐々に白濁し（逆ミセルが形成されていると考えられる）、さらに水相を導入すると超臨界二酸化炭素（および逆ミセル）への水の溶解限界を越えた時点で反応容器底部に白濁した水相が形成される。所定水相を注入した後、減圧することにより均一なりポソームが得られる。

- 10 本発明方法により、直径50nm～800nmの単層ラメラリポソームを製造することができる。本発明方法により、7～30%という高い保持効率を有するリポソームを製造することができる。

- 15 本発明方法により製造したリポソームは、リポソームの膜枚数が少ないため、より生体膜に近い生体膜モデルとして有用と考えられる。また、本発明のリポソームは人体に対して有害な有機溶媒を使用していないため、残存有機物の毒性が内。従って、香粧品の有効成分を防ぐ基材、もしくは経皮吸収を促進する製剤、医薬品の有効成分の失活を防ぐ基材、副作用を著しく低減するDDS製剤等として有用である。

- 20 以下に、図面を用いて本発明のリポソームの製造装置および製造方法を説明する。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は、本発明装置の第1実施形態の一例を示すフロー図。  
図2は、本発明装置の第2実施形態の一例を示すフロー図。  
25 図3は、本発明装置の第1実施形態の一例を示すフロー図。  
図4は、従来の超臨界二酸化炭素法によるリポソームの製造方法を示すフロー図。  
図5は、実施例1で調製したリポソームの透過型電子顕微鏡による撮影像を示



す図。

図 6 は、実施例 2 で調製したリボソームの透過型電子顕微鏡による撮影像を示す図。

図 7 は、実施例 3 で調製したリボソームの透過型電子顕微鏡による撮影像を示す図。

図 8 は、実施例 4 で調製したリボソームの脂質濃度と保持効率の関係を示すグラフ。

#### 符号の説明

- 1 耐圧反応器
- 10 2 攪拌機
- 3 ポンプ
- 4 調圧弁
- 5 リボソーム
- 6 受け器
- 15 7 ポンプ
- 8 ポンプ

#### 発明を実施するための最良の形態

##### (第 1 実施形態)

図 1 は、本発明の第 1 実施形態の一例を示すフロー図である。

本実施形態では、あらかじめ超臨界二酸化炭素、リン脂質または糖脂質、および助溶媒の均一混合流体を耐圧反応器 1 内へ圧入する。圧入した均一混合流体を、攪拌機 2 により激しく攪拌しながら、そこへ、封入物質を含む水相を、水相流入手段であるポンプ 3 を介して耐圧反応器 1 へ滴下させる。水相を一定量滴下した後、減圧し耐圧反応器 1 を開けると、封入物質が内包されたリボソームが得られる。

##### (第 2 実施形態)

図 2 は、本発明の第 2 実施形態の一例を示すフロー図である。図 1 と同一の構

成要素には、同一の符号を付している。

本実施形態でも、あらかじめ超臨界二酸化炭素、リン脂質または糖脂質、および助溶媒の均一混合流体を耐圧反応器 1 内へ圧入する。圧入した均一混合流体を、攪拌機 2 により激しく攪拌しながら、そこへ、封入物質を含む水相を、水相流入手段であるポンプ 3 を介して耐圧反応器 1 へ滴下させる。

第 1 実施形態と異なるのは、リポソーム排出手段として調圧弁 4 を設けたことである。調圧弁 4 により、耐圧反応器 1 内の圧力が一定圧力以上となった場合、リポソーム 5 が排出され、受け器 6 へリポソーム 5 が貯留されるようになっている。

#### 10 (第 3 実施形態)

図 3 は、本発明の第 2 実施形態の一例を示すフロー図である。図 2 と同一の構成要素には、同一の符号を付している。

図 3 中、8 は助溶媒に均一に分散させたリン脂質または糖脂質を耐圧反応器 1 へ流入させるリン脂質等流入手段としてのポンプであり、9 は水溶性または親水性の封入物質を含む水相を流入させる水相流入手段としてのポンプである。

本実施形態では、耐圧反応器 1 へ、超臨界二酸化炭素、リン脂質または糖脂質と助溶媒、および水相を、ポンプ 7, 8, 3 により同時に流入させ、攪拌機 2 で攪拌し、リポソームを形成させるものである。

調圧弁 4 により、耐圧反応器 1 内の圧力が一定圧力以上となった場合、リポソーム 5 が排出され、受け器 6 へリポソーム 5 が貯留されるようになっている。

本実施形態の装置により、リポソームを連続的に製造することが可能となる。

### 実施例

#### 実施例 1、比較例 1

25 図 1 に示した製造装置を用いてリポソームを調製した。耐圧反応器は SUS 304 製のサファイヤ窓付きの容積可変セルを用いた（セルの内容積：57.02 cm<sup>3</sup>）。耐圧反応器に DPPC（ジパルミトイルホスファチジルコリン）0.014 g と超臨界二酸化炭素 13.749 g（圧力 200 気圧、温度 60℃）の混

合流体を仕込み、激しく攪拌しながら、3.5% VC-PMG（リン酸-L-アスコルビルマグネシウム）水溶液2.81mlを、流速0.05cc/minでポンプにより注入し、VC-PMGを内包するリポソームを調製した。得られたリポソームの形状を透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した。得られたリポソームは、その大きさが100-1000nmの大きな一枚膜リポソーム（LUV: large unilamellar vesicle）であった。そのTEM撮影像を図5に示す。

得られたリポソームの保持効率を定法であるグルコース透析法により求めた。比較例1として、汎用される調製法である超音波処理法（バンガム法）により調製したリポソームの保持効率も求め、その結果を表1に示した。

表1

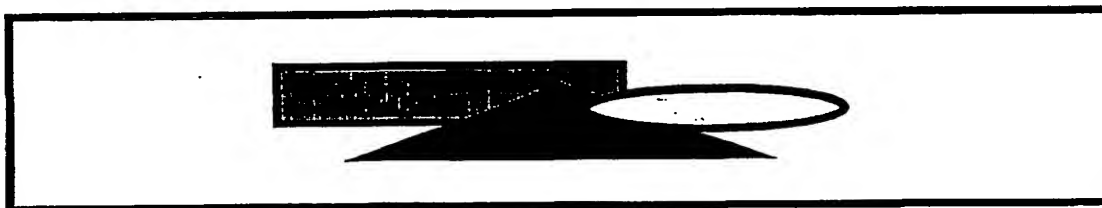


表1に示した結果から明らかなように、超臨界二酸化炭素を用いた本発明の実施例1のリポソームは、従来の超音波法により調製した比較例1のリポソームに比して、保持効率が10倍以上であることが分かる。

## 実施例2

図2に示した製造装置を用いてリポソームを調製した。耐圧反応器は実施例1と同じものを用いた。耐圧反応器に水添大豆レシチン0.014g、超臨界二酸化炭素13.794g（圧力200気圧、温度60℃）およびエタノール0.96gの混合流体を仕込み、激しく攪拌しながら、3.5% VC-PMG（リン酸-L-アスコルビルマグネシウム）水溶液2.81mlを、流速0.05cc/minでポンプにより注入した。調圧弁の圧力を200kgf/cm<sup>2</sup>に設定し、VC-PMGを内包するリポソームを得た。得られたリポソームの形状を透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した。得られたリポソームは、その大きさが100-1000nmの大きな一枚膜リポソーム（LUV: large unilamellar

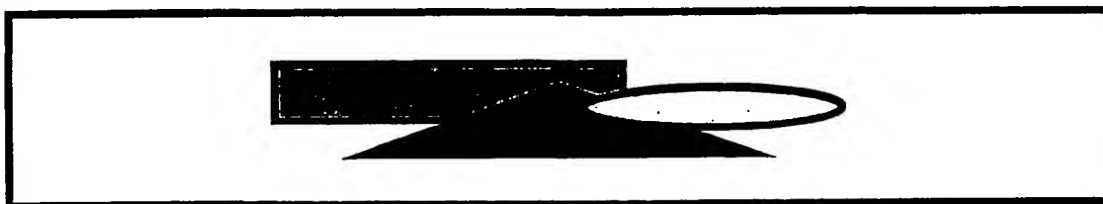
vesicle) であった。そのTEM撮影像を図6に示す。

### 実施例3、比較例2

図2に示した製造装置を用いてリポソームを調製した。耐圧反応器は実施例1  
 5 と同じものを用いた。耐圧反応器に水添卵黄レシチン0.041g、超臨界二酸化炭素（圧力200気圧、温度60℃）およびエタノール0.96gの混合流体を仕込み、激しく攪拌しながら、イブプロフェン10mgと水2.81mlを混合溶解させた水溶液を、流速0.05cc/minでポンプにより注入した。調圧弁の圧力を200kgf/cm<sup>2</sup>に設定し、イブプロフェンを内包するリポソームを得た。得られたリポソームの形状を透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した。得られたリポソームは、その大きさが100-1000nmの大きな一枚膜リポソーム（LUV: large unilamellar vesicle）  
 10 であった。そのTEM撮影像を図7に示す。

得られたリポソームを超遠心（45000rpm）によりリポソーム中の内水相のみを取り出し、薬剤の定量を行った。比較例2として、汎用される調整法である超音波処理法（バンガム法）により調製したリポソームの薬剤の定量を行った。その結果を表2に示す。

表2



20 表2に示した結果から明らかなように、超臨界二酸化炭素を用いた本発明の実施例3のリポソームは、従来の超音波法により調製した比較例2のリポソームに比して、リポソーム中における薬剤の含有量が10倍以上であることが分かる。

### 実施例4

25 実施例1と同じ装置で、下記条件によりリポソームを調製した。

## 調製条件；

温度 60℃、圧力 200bar、脂質0.0353 g、エタノール（脂質を溶解させる為に使用）0.7963g、CO<sub>2</sub> 12.1849 g、グルコース溶液の流速 0.1ml/min

使用した脂質；DOPC ジオレイルホスファチジルコリン

5 DPPC ジパルミトイルホスファチジルコリン

DSPC ジステアロイルホスファチジルコリン

以上の条件下で超臨界リポソームの調製を行い、各リポソームの保持効率を求め、その結果を図8のグラフに示した。

- 10 縦軸に保持効率（％）、横軸に添加している水の量に対する各脂質濃度をとると、いずれの場合においても、一般の調製法であるバンガム法によって調製されたりポソームの保持効率（2～3％）に比べ、高い値を示していることが分かる。

## 産業上の利用可能性

- 15 本発明方法および本発明装置により、保持効率の高いリポソームが、一段で効率的に製造できるようになった。本発明方法により製造されたりポソームは保持効率が高いため、本発明のリポソームを外用剤に利用した場合は経皮吸収の増加が、内服薬に利用した場合は体内への吸収が増加する。

- 20 水相の媒体として、海洋深層水またはその逆浸透濾過水を使用することにより、細胞増殖を促進しかつ、経皮吸収のよいリポソームが得られる。

## 請求の範囲

- (1) 超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素とリン脂質または糖脂質の均一混合流体中に、封入物質を含む水相を加えることを  
5 特徴とする封入物質を内包したリポソームの製造方法。
- (2) 前記混合流体が助溶媒を含むことを特徴とする請求項 1 に記載のリポソームの製造方法。
- (3) 前記水相が海洋深層水または海洋深層水の逆浸透膜濾過水を含むことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載のリポソームの製造方法。
- 10 (4) 封入物質が、少なくとも 1 種の水溶性または親水性の薬理活性成分であることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 3 のいずれか 1 項に記載のリポソームの製造方法。
- (5) 封入物質が、少なくとも 1 種の水溶性色素であることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 3 のいずれか 1 項に記載のリポソームの製造方法。
- 15 (6) アスコルビン酸またはその塩、亜硫酸塩を酸化防止剤として水相に含有することを特徴とする請求項 5 に記載のリポソームの製造方法。
- (7) 超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素とリン脂質または糖脂質の均一混合流体を圧入する耐圧反応器と、該耐圧反応器内の混合流体中へ、封入物質を含む水相を流入させる水相流入手段を有することを  
20 特徴とする封入物質を内包したリポソームの製造装置。
- (8) 耐圧反応器と、該耐圧反応器へ、超臨界状態または臨界点以上の温度もしくは圧力条件下の二酸化炭素を流入させる超臨界二酸化炭素流入手段と、助溶媒に均一に分散させたリン脂質または糖脂質を流入させるリン脂質等流入手段と、封入物質を含む水相を流入させる水相流入手段を有することを特徴とする封入物  
25 質を内包したリポソームの製造装置。
- (9) リポソーム排出手段を設けたことを特徴とする請求項 7 または請求項 8 に記載したリポソームの製造装置。

図 1

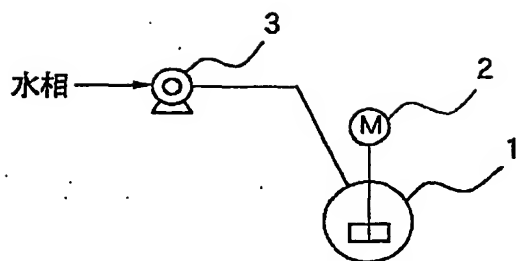


図 2

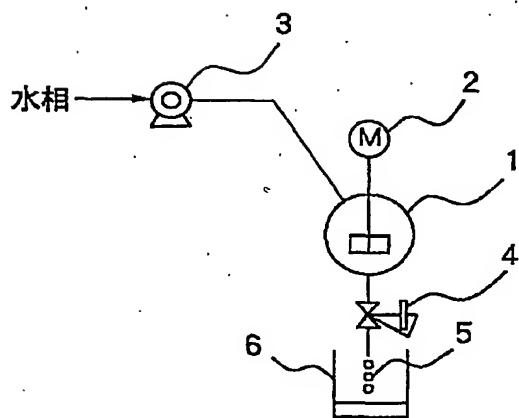


図 3

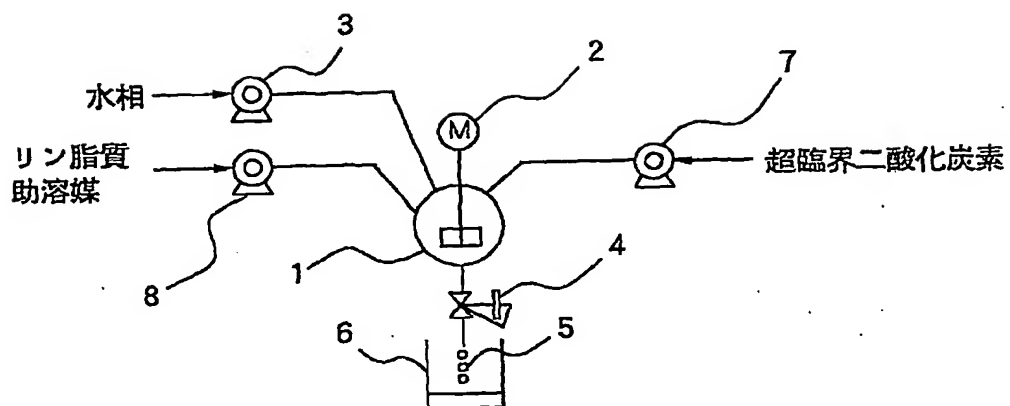


図 4

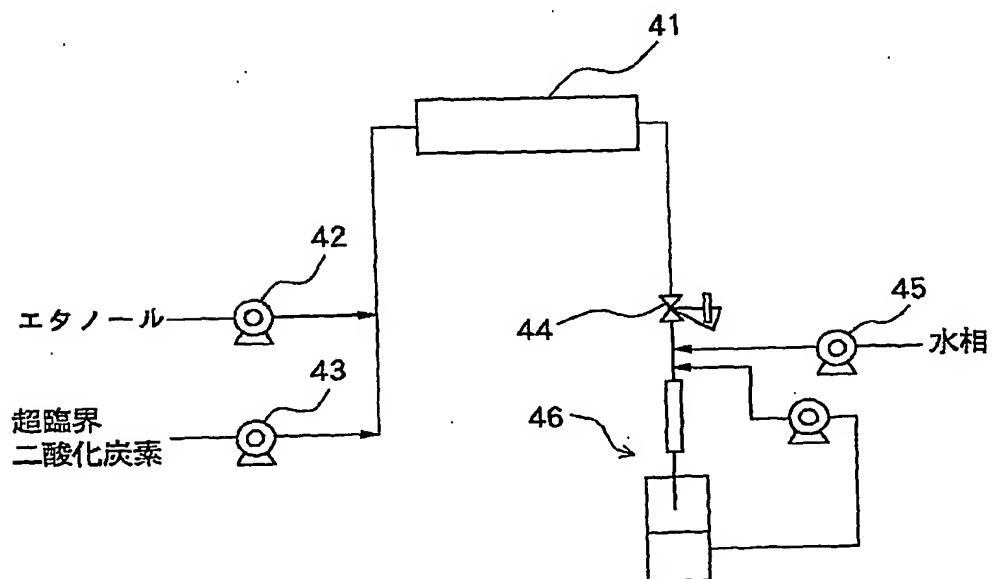




図 5



200nm

図 6



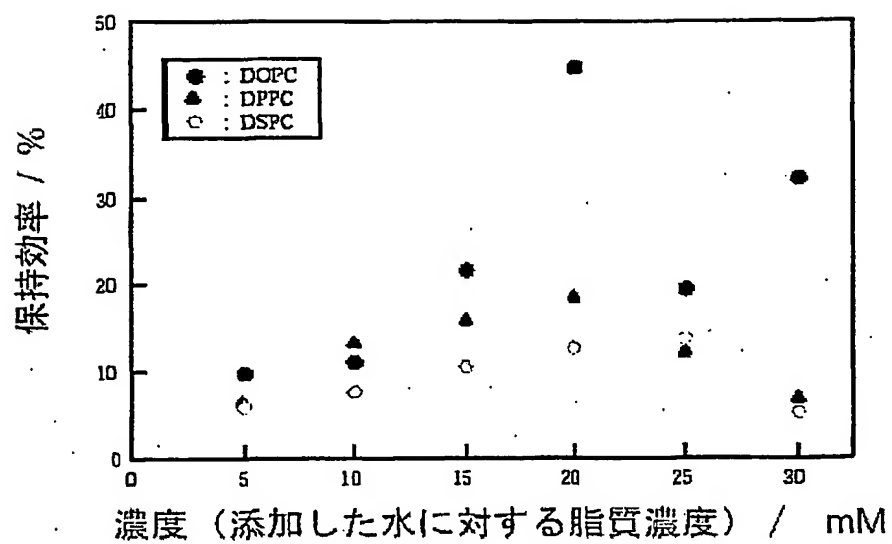
200nm

図 7



100nm

図 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08907

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> B01J3/00, B01J13/02, A61K9/127, A61J3/07

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> B01J3/00, B01J13/02, A61K9/127, A61J3/07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5700482 A1 (Ciba-Geigy Aktiengesellschaft), 23 December, 1997 (23.12.97), & JP 6-315624 A	1-9
A	US 5554382 A1 (Aphios Corporation), 10 September, 1996 (10.09.96), & JP 10-509459 A	1-9
A	EP 855906 A (Research Triangle Pharmaceuticals), 05 August, 1998 (05.08.98), & JP 11-514367 A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 27 December, 2001 (27.12.01)

Date of mailing of the international search report  
 15 January, 2002 (15.01.02)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01J3/00, B01J13/02, A61K9/127, A61J3/07

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01J3/00, B01J13/02, A61K9/127, A61J3/07

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5700482 A1 (CIBA-GEIGY AKTIE NGESELLSCHAFT) 1997. 12. 23&JP 6- 315624 A	1-9
A	US 5554382 A1 (APHIOS CORPORATI ON) 1996. 09. 10&JP 10-509459 A	1-9
A	EP 855906 A (RESEARCH TRIANGLE PHARMACEUTICALS) 1998. 08. 05&JP 11-514367 A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 12. 01

国際調査報告の発送日

15.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

豊永 茂弘



4Q 8418

電話番号 03-3581-1101 内線 3467

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**